JACEK ROSZKOWSKI

Najnowsze osiągnięcia w zakresie badań nad chorobą Mareka

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr J. ZADURA

Choroba Mareka stanowi poważny problem ekonomiczny we wszystkich lub prawie wszystkich krajach posiadających rozwiniętą hodowlę drobiu. Z tego też powodu stała się ona w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań, które rzuciły nowe światło na jej etiologię, patogenezę oraz na perspektywy profilaktyki. Rozwój tych badań zdopingowany został nie tylko względami ekonomicznymi. To niezwykle interesujące schorzenie stanowi także przedmiot dociekań czysto naukowych, gdyż jest doskonałym modelem doświadczalnym dla badań nad nowotworami pochodzenia wirusowego. Wyjaśnienie wielu spraw przy chorobie Mareka może przyczynić się do lepszego zrozumienia etiologii i patogenezy tych schorzeń, a w szczególności schorzeń białaczkowych.

Czynnik etiologiczny

Przez wiele lat choroba Mareka była uważana za schorzenie zakaźne, ale dopiero przeniesienie doświadczalne (4, 56), a następnie wyizolowanie czynnika zakaźnego potwierdziły te przypuszczenia. Czynnikiem zakaźnym wyosobnionym niezależnie od siebie przez Churchilla i Biggsa (25) oraz Solomona i wsp. (40) okazał się wirus typu DNA z grupy *Herpes*. Autorzy ci stwierdzili, że hodowle nerki kurzej lub fibroblastów zarodków kaczych zakażone zawiesiną komórek guzów białaczkowych bądź krwią chorych kurcząt wykazywały efekt cytopatyczny charakterystyczny dla wirusów tej grupy. Obserwacje powyższe zostały potwierdzone badaniami w mikroskopie elektronowym, w których wykazano obecność typowych dla Herpeswirusów cząsteczek elementarnych (1, 25, 26, 32, 39, 40, 55, 59). Udało się także udowodnić, że wyizolowany czynnik wirusowy istotnie powoduje chorobę Mareka. Stwierdzono bowiem, że zakażone wirusem hodowle tkankowe wywoływały u kurcząt typowe objawy chorobowe. Zauważono przy tym wysoką korelację pomiędzy zdolnością wirusa do tworzenia łysinek a jego zakaźnością dla kurcząt (8).

Identyfikacja czynnika etiologicznego przyczyniła się do szybkiego rozwoju szeregu wirusologicznych i serologicznych metod ułatwiających jego wykrywalność. Z metod tych stosowanych obecnie najczęściej należy wymienić: namnażanie wirusa w hodowli nerki kurzej lub fibroblastów zarodków kaczych (18, 26, 68) technikę przeciwciał fluorescencyjnych służącą do lokalizacji antygenu wirusowego (15, 17, 19, 37, 48, 50), precypitację w żelu agarowym do wykrywania przeciwciał w surowicy (23), identyfikację materiału na zarodkach kurzych (10, 13, 14, 16, 26) oraz mikroskopię elektronową używaną do badania komórek zakażonych *in vivo* lub *in vitro* (1, 19, 32, 39, 40, 56, 66).

Przy pomocy przeciwciał fluorescencyjnych i mikroskopu elektronowego udało się ustalić lokalizację antygenu wirusowego w organiźmie. Stwierdzono, że może on występować w różnych narządach i tkankach, ale szczególne powinowactwo wykazuje w stosunku do torby Fabrycjusza i nerek (15, 17, 19, 50, 63). Niezwykle zaskakującym faktem w tych badaniach była niemożność stwierdzenia antygenu lub cząsteczek wirusowych w komórkach guzów białaczkowych i niektórych hodowli tkankowych mimo, że komórki te, w przeciwieństwie do komórek torby Fabrycjusza i nerek, były wysoce zakaźne zarówno *in vivo*, jak *in vitro* (4, 18, 24, 26, 59). Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można przypuszczać, że w komórkach tych wirus występuje jedynie w postaci genomu, zaś w torbie Fabrycjusza ,nerkach i innych nie wykazujących zakaźności narządach w formie cząsteczek niekompletnych.

Jako cząsteczka nieokryta, wirus choroby Mareka (MD) jest silnie związany z komórką, a po jej zniszczeniu traci całkowicie swoją zakaźność (32, 39, 55). Przez dłuższy czas stanowiło to intrygującą zagadkę wobec obserwacji epizootiologicznych z których wynikało, że choroba Mareka jest schorzeniem wysoce zakaźnym przenoszonym na drodze bezpośredniego bądź pośredniego kontaktu wykluczającego możliwość zachowania żywej komórki. Niedawno problem ten został wyjaśniony przez autorów amerykańskich którym przy pomocy mikroskopu elektronowego i przeciwciał fluorescencyjnych udało się wykazać, że wirus MD może także występować w formie cząsteczek kompletnych, a tkanką w której one są obecne i z której wydalane są do otoczenia okazały się komórki nabłonka brodawek piórowych (19, 20, 50). Stwierdzono także, że zniszczone przez wysuszenie brodawki piórowe wykazywały pełną zakaźność tak dla hodowli tkankowej, jak i dla kurcząt. Ostatnio Nazerian (41) po wielokrotnych pasażach zauważył obecność kompletnych cząsteczek wirusowych w hodowli fibroblastów zarodków kaczych.

Dotychczas stwierdzono przynajmniej 6 antygenów wirusowych znajdujących się w zakażonej hodowli nerki kurzej (27). Z antygenów tych jednak tylko 3 antygeny, określone jako A, B, i C, wykazuje się regularnie. Antygen A, dający najsilniejszą linię precypitacyjną, obecny jest w supernatancie hodowli tkankowej i w samych komórkach. Natomiast pozostałe antygeny występują tylko wewnątrzkomórkowo.

Wielokrotne pasażowanie wirusa w hodowli tkankowej powoduje szereg zmian z których należy wymienić zanik antygenu A oraz utratę patogenności dla kurcząt (27, 41). Spostrzeżenie to stało się bodźcem do badań nad właściwościami uodparniającymi zmienionego wirusa. Obserwacje Churchilla i wsp. (28) wykazały, że szczepienie jednodniowych lub dwutygodniowych kurcząt atenuowanym wirusem wywarło działania ochronne przed zakażeniem szczepem patogennym. Szczepienie to nie zapobiegało jednak samemu zakażeniu i namnażaniu się wirusa, a tylko chroniło organizm przed skutkami infekcji.

Epizootiologia

Wirus wydalany do otoczenia wraz ze złuszczającym się nabłonkiem brodawek piórowych i pierzem chorych kurcząt może być łatwo przenoszony z ptaka na ptaka i ze stada do stada drogą aerogenną lub przez przedmioty zanieczyszczone znajdującym się w kurnikach pyłem. Jak wynika z szeregu publikacji, przeżywalność wirusa w kurzu jest bardzo dobra i może wynosić nawet 4 do 5 miesięcy (3, 33, 36, 67). Wiąże się to prawdopodobnie z tym, że złuszczone komórki nabłonka zawierające wirus są silnie zrogowaciałe i stanowią dodatkową osłonę przed działaniem środowiska zewnętrznego.

Mimo licznych wysiłków nie udało się do tej pory rozstrzygnąć definitywnie sprawy przenoszenia wirusa przez jaja. Z wyjątkiem jednego doniesienia (58), próby przeniesienia choroby Mareka przez jaja wypadły negatywnie i nie wydaje się aby ta droga rozprzestrzeniania się choroby posiadała istotne znaczenie epizootyczne (60, 70).

Badania nad dynamiką rozwoju choroby w stadzie wykazały, że kurczęta tuż po wylęgu są wolne od wirusa, ale przebywając w zapowietrzonym środowisku dość szybko ulegają zakażeniu, najczęściej między 2 a 12 tygodniem życia, i po upływie 8—20 tygodni prawie 100% pogłowia kurcząt wykazuje obecność wirusa w ustroju (70). Chociaż w przebiegu zakażenia większość kurcząt wytwarza przeciwciała, to jednak przez długi czas są one nosicielami zarazka i wydalają go do środowiska zewnętrznego (28). Wytworzone przeciwciała mogą być przekazywane potomstwu jako przeciwciała matczyne które, jak wynika z badań Chubba i Churchilla (24) oraz Spencera i wsp. (62), wykazują działanie ochronne, zmniejszając znacznie zachorowalność i śmiertelność po zakażeniu szczepem zjadliwym. Z drugiej jednak strony Biggs i wsp. (cyt. za 11) stwierdzili, że kurczęta jednodniowe są w jednakowym stopniu, a czasem nawet bardziej, wrażliwe na zakażenie chorobą Mareka niż kurczęta 3—4 tygodniowe, u których nie wykrywa się już przeciwciał matczynych. Sugerowałoby to, że w tym przypadku odporność na zakażenie jest wynikiem nie tyle obecności przeciwciał matczynych, ile wytworzenia się przeciwciał po zetknięciu się ptaka z niepatogennym lub mało zjadliwym wirusem. Jak wykazały badania Kottaridisa i Luginbuhla (38) zdolność do wytwarzania przeciwciał posiada duże znaczenie dla samego przebiegu schorzenia. Autorzy ci stwierdzili, że kurczęta u których pojawiły się przeciwciała w 2—4 tygodnie po zakażeniu wirusem były w stanie przeżyć schorzenie ponad 10 tygodni. W przeciwieństwie do nich kurczęta bez wykrywalnych przeciwciał lub z przeciwciałami o niskim poziomie nie były w stanie przeżyć zakażenia. Ponadto ptaki starsze wytwarzały przeciwciała wcześniej i o wyższym mianie niż ptaki młodsze. Może to w pewnym stopniu tłumaczyć zmniejszoną wrażliwość na zakażenie wirusem MD obserwowaną u starszego drobiu (17).

Klasyczne badania Hutta i Cole'a (35), a później innych autorów (7, 9, 29, 47) wykazały, że wśród kur istnieją linie o różnej wrażliwości genetycznej na zakażenie wirusem MD. Wrażliwość ta może wahać się w granicach od 12 do 90% (29). Starano się poznać przyczyny i mechanizm obserwowanego zjawiska. Rezultaty uzyskane przez Biggsa i Milne'a (cyt. za 44) wykazały, że na zakażonych wirusem błonach kosmówkowo-omoczniowych zarodków pochodzących od kur o różnej wrażliwości genetycznej pojawiła się jednakowa ilość ognisk. Podobnie Spencer (61) stwierdził, że hodowle nerek od kur o różnej odporności były jednakowo wrażliwe na zakażenie wirusem. Wyniki powyższych badań zdają się wskazywać, że mamy tu do czynienia nie tyle z odpornością na zakażenie wirusem co z odpornością na rozprzestrzenianie się wirusa w ustroju. Przemawiają za tym obserwacje Spencera (61), który zauważył prostą zależność pomiędzy ilością wykrywanego w nerkach wirusa a ich odpornością genetyczną, oraz badania Calneka i Hitchnera (17), którzy, porównując stopień zakażenia wirusem kurcząt wrażliwych i odpornych przy pomocy przeciwciał fluorescencyjnych, precypitacji i badań histologicznych, stwierdzili znacznie większe zakażenie tkanek i komórek u kurcząt genetycznie wrażliwych. Metody selekcji linii genetycznie odpornych zostały dokładnie opisane w pracach Biggsa i wsp. (9) oraz Cole'a (29).

Patologia

Mimo istnienia licznych publikacji opisujących szczegółowo zmiany obserwowane przy chorobie Mareka (6, 43, 47, 54) niewiele jest wiadomo o patogenezie samego procesu chorobowego. Przez wiele lat charakter zmian w nerwach i narządach wewnętrznych był przedmiotem kontrowersyjnych dyskusji. Campbell (21, 22), Wight (64, 65) oraz Heald i wsp. (34) uważali, że choroba Mareka jest procesem zapalnym, a rozplem komórek pojawia się wtórnie.

Odmienne stanowisko zajęli Payne i Biggs (43), którzy twierdzą, że proliferacja w zakresie układu limfoidalnego jest procesem pierwotnym i posiada cechy rozrostu nowotworowego, natomiast zmiany zapalne w nerwach należy traktować jako proces wtórny, występujący zwykle w przypadkach cofnięcia się zmian proliferatywnych. Według wspomnianych autorów faza proliferatywna ma być charakterystyczna dla ostrej formy choroby, zaś regresywna dla formy klasycznej. Możliwość regresji zmian proliferatywnych znalazła potwierdzenie w badaniach Aigstera i Schimittle'a (cyt. za 44), którzy fotografując w różnych okresach czasu guzy białaczkowe u tych samych kurcząt stwierdzili cofanie się zmian nowotworowych, głównie w śledzionie, wątrobie i gruczołach płciowych, u niektórych ptaków zakażonych przez kontakt.

Schorzenia nowotworowe, w których zaangażowany jest układ limfoidalny muszą niewątpliwie wywierać jakiś wpływ na reakcje immunologiczne ustroju. Badania wykonane pod tym kątem przy chorobie Mareka wykazały, że przy normalnym poziomie IgG i IgM zarówno pierwotna, jak i wtórna odpowiedź immunologiczna były wyraźnie osłabione, odczyn na przeszczepy był normalny lub nieco opóźniony, reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi była zwiększona lub normalna, zaś odczyn na tuberkulinę był nieznacznie, ale w sposób istotny obniżony (45, 49). Wprawdzie wyniki te świadczą o pewnym zaangażowaniu w sprawę chorobową tak układu bursozależnego, jak i grasiczozależnego, to jednak ostatnie badania Payne'a i Renniego (46) wykazały, że rozwój zmian białaczkowych jest niezależny od torby Fabrycjusza, a zatem przeważająca część komórek tworzących guzy i nacieki musi pochodzić z innego źródła niż układ bursozależny. W pewnym stopniu obserwacje te zostały potwierdzone przez Roszkowskiego i wsp. (54), którzy badając kompetencję immunologiczną komórek guzów białaczkowych techniką Jernego (LHG) zauważyli, że tylko niewielka ilość komórek wytwarzała przeciwciała po uodpornieniu kurcząt krwinkami owczymi.

Perspektywy profilaktyki

Mimo niewątpliwie ogromnego postępu w badaniach nad chorobą Mareka, nie mamy jak dotychczas skutecznych metod profilaktycznych mogących znaleźć szerokie zastosowanie. Teoretycznie walka z tą chorobą może polegać albo na ochronie przed skutkami infekcji, co osiąga się przez szczepienia albo na zapobieganiu zakażeniu, co można uzyskać poprzez higieniczną hodowlę lub oparcie hodowli na liniach niewrażliwych genetycznie.

Jeśli chodzi o metody immunologiczne to obecnie przedmiotem intensywnych badań są szczepionki oparte na apatogennym szczepie terenowym (53) i na atenuowanym szczepie HPRS-16 (12, 28). Duże nadzieje wiąże się ponadto ze szczepionką opartą na Herpeswirusie wyizolowanym przez Wittera i wsp. (69) od indyków. Wirus ten okazał się podobny antygenowo do wirusa MD, niepatogenny dla kur, i co najważniejsze posiadał bardzo dobre właściwości uodparniające (30, 31, 42). Istnieją jednak podejrzenia, że ze względu na powyższe cechy jest on po prostu jakąś odmianą wirusa MD. Powszechnie przyjmuje się, że dobra szczepionka nie tylko powinna być niepatogenna i posiadać dobre właściwości immunogenne, ale także powinna być stosunkowo tania w produkcji oraz łatwa w dystrybucji i stosowaniu. Jak do tej pory szczepionki przeciwko chorobie Mareka mimo swoich zalet, jak dobre walory ochronne i niepatogenność, posiadają szereg cech, które ograniczają powszechne stosowanie. Są to przede wszystkim: wysoki koszt produkcji, trudności w przechowywaniu i transporcie (konieczność zachowania żywej komórki), potrzeba szczepień indywidualnych, niebezpieczeństwo trwałego nosicielstwa wirusa szczepionkowego oraz niezdolność przeciwdziałania zakażeniu szczepem zjadliwym nie wywołującym wprawdzie choroby u kurcząt szczepionych, ale mogącym stanowić zagrożenie dla ptaków nieszczepionych.

Obiecujące perspektywy w walce z chorobą Mareka, szczególnie w hodowlach przemysłowych, zarysowują się w metodach hodowlanych zapewniających kurczętom odpowiednią izolację i wysoki poziom higieny. Osiągnąć to można przez budowę pomieszczeń łatwych do odkażania, wyposażonych w urządzenia do filtrowania wchodzącego i wychodzącego powietrza oraz do wytwarzania nadciśnienia w miejscu przebywania drobiu. W pomieszczeniach takich kurczęta mogłyby być trzymane przez okres największej wrażliwości na zakażenie tj. przynajmniej w czasie pierwszych 2—3 miesięcy życia. Jak wykazały badania Bearda i wsp. (2) zastosowanie filtrowanego powietrza i nadciśnienia nie tylko zapobiegło zakażeniu kur wirusem MD, ale także rzekomym pomorem drobiu i zakaźnymi chorobami układu oddechowego mimo, że ptaków trzymanych w tych warunkach przez 4 lata nie poddawano żadnym szczepieniem.

Wykaz piśmiennictwa, w liczbie 70 pozycji, znajduje się u Autora.

Adres autora: dr Jacek Roszkowski, Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

LEWIS C. J., OAKLEY G. A.: Zastosowanie chloropromazyny w leczeniu bezmleczności macior. (The use of chloropromazine in swine agalactia). Vet. Rec.. 88, 380, 1971 (15).

Leczenie bezmleczności u macior na drodze dożylnego stosowania oksytocyny oraz domięśniowo penicyliny i streptomycyny dawało wyniki pozytywne w 98%. Jednakże w dużej ilości przypadków notowano nawroty choroby. Odsetek nawrotów obniżono bardzo znacznie przez podawanie oprócz oksytocyny i antybiotyków, chloropromazyny. Przy zastosowaniu tej metody leczenia u 100 świń u 96 sztuk uzyskano poprawę jedynie w 37 przypadkach zachodziła konieczność powtarzania leczenia. Oprócz chloropromazyny stosowano również pentabarbiton sodu, jednakże właściciele nie wyrażali zgody na stosowanie znieczulenia ogólnego. Z.